

نیتریک اکسید سنتاز قابل القاء و آسیب حاد کلیوی القاء شده توسط ایسکمی/خونسازی مجدد در رت‌های بیهوش شده

دکتر فیروزه غلامپور¹، دکتر سید مصطفی شید موسوی²، دکتر سید محمد اوجی³، دکتر سهراب حاجی زاده⁴

- 1- دانش آموخته دکترای فیزیولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 2- دانشیار، دکترای فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- 3- استادیار، متخصص پاتولوژی، گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- 4- استاد، دکترای فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت 87/12/11، تاریخ پذیرش 88/5/26

چکیده

مقدمه: آسیب حاد کلیوی القاء شده توسط ایسکمی/خونسازی مجدد باعث ایجاد اختلالات در عملکرد دفعی نفرون‌ها می‌شود. این آسیب بیان نیتریک اکساید سنتاز قابل القاء در بافت کلیه را افزایش می‌دهد. مهار بیان و فعالیت این فاکتور می‌تواند آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی/خونسازی مجدد را بهبود بخشد. هدف از این مطالعه بررسی نقش نیتریک اکساید سنتاز قابل القاء در پیشرفت اختلالات عملکردی کلیه طی دوره خونسازی مجدد پس از ایسکمی بود.

روش کار: در این پژوهش تجربی عملکرد همودینامیک و دفعی کلیه در 30 رت نر اسپراگ-داولی بررسی شد. یک دوره کلیرانس 30 دقیقه‌ای صورت پذیرفت. متعاقب 30 دقیقه کلمپ کردن هر دو شریان کلیوی، چهار دوره کلیرانس 30 دقیقه‌ای متوالی طی خونسازی مجدد انجام شدند در حالی که حیوانات سالین یا ممانت کننده انتخابی نیتریک اکساید سنتاز قابل القاء (ال - نیل) وریدی به میزان 3 میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت می‌کردند. در نمونه‌های پلاسما و ادرار، غلظت کراتینین و سدیم اندازه‌گیری شد.

نتایج: ایسکمی کلیوی به مدت 30 دقیقه میزان فیلتراسیون گلومرولی و اسمولالیته ادرار را طی خونسازی مجدد کاهش داد اما میزان جریان ادرار و دفع سدیم افزایش یافت. ال - نیل قبل از ایسکمی، میزان فیلتراسیون گلومرولی و اسمولالیته ادرار را تغییر نداد اما طی خونسازی مجدد آنها را بهبود بخشید و موجب افزایش میزان جریان ادرار شد. هم‌چنین افزایش دفع سدیم ناشی از ایسکمی را کاهش داد.

نتیجه گیری: آنزیم نیتریک اکساید سنتاز قابل القاء در برقراری و پیشبرد اختلالات در عملکردهای همودینامیک و دفعی کلیه در ساعات اولیه بعد از ایسکمی نقش مهمی دارد.

واژگان کلیدی: فیلتراسیون گلومرولی، نیتریک اکساید سنتاز قابل القاء، ایسکمی، ال - نیل، خونسازی مجدد

*نویسنده مسئول: شیراز، خیابان زند، دانشکده پزشکی، طبقه ششم، گروه فیزیولوژی

Email:Shidmoosavi@yahoo.com

مقدمه

ایسکمی عامل مهم نارسایی حاد کلیوی است که با آغاز کردن رویدادهای پیچیده و مرتبط به هم موجب آسیب و نهایتاً مرگ سلول‌های کلیه می‌گردد. این موضوع زمانی بغرنج‌تر می‌شود که بدانیم خونرسانی مجدد، اگر چه برای زنده ماندن بافت ایسکمیک لازم است، در ایجاد نارسایی حاد کلیوی سهمیم است (1). مطالعات نشان داده‌اند که شرایط ایسکمی-خونرسانی مجدد موجب القاء ایزوفرم نیتریک اکسید سنتاز قابل القاء (inducible Nitric oxide synthase- iNOS) می‌گردد، که به دنبال آن سنتز نیتریک اکسید (Nitric oxide- NO) بیش از حد فیزیولوژیک افزایش می‌یابد و NO هم با آنیون‌های سوپر اکسید واکنش داده و با تشکیل پروکسی نیتريت به بافت کلیه آسیب می‌رساند (2) و به علاوه با مهار نمودن ایزوفرم نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیال (endothelial Nitric oxide synthase (eNOS) - در جهت افزایش انقباض آرتریول‌ها و در نتیجه کاهش جریان خون کلیوی و میزان فیلتراسیون گلوبومرولی هم نقش دارد (3). مطالعات گوناگون آزمایشگاهی (In vitro) و داخل بدن (In vivo) نشان داده‌اند که مهار بیان iNOS و مهار فعالیت iNOS با استفاده از ممانعت کننده‌های اختصاصی آن می‌تواند آسیب کلیوی با میانجیگری NO را بهبود بخشد یا از آن جلوگیری کند (1، 4-8). این نشان می‌دهد که NO حاصل از القاء فعالیت بیش از حد iNOS در آسیب‌های کلیوی ناشی از ایسکمی و خونرسانی مجدد سهمیم است و مهار تولید آن می‌تواند موجب بهبودی آسیب‌های حاصله گردد.

بنابر این، در مطالعه حاضر از یک ممانعت کننده اختصاصی ایزوفرم iNOS با نام ال- نیل (N6-(1- L- Lysine hydrochloride)- Iminoethyl) در نارسایی حاد کلیوی ایسکمیک استفاده گردید تا روند تغییرات همودینامیک، دفعی و قدرت تغلیظ کنندگی کلیه حاصل از ایسکمی دو طرفه کلیوی در طی یک دوره دو ساعته خونرسانی مجدد در فواصل زمانی 30 دقیقه‌ای

مشخص شود و نقش iNOS در روند این تغییرات تعیین گردد.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی بوده و بر روی موش‌های صحرایی انجام گرفته است. در این تحقیق 30 موش صحرایی نر از نژاد اسپراگ داوولی با وزن 290 تا 340 گرم در شروع آزمایش که در شرایط 22-24 درجه سانتی‌گراد و سیکل روشنایی-خاموشی 12 ساعت (7 صبح تا 7 شب روشن و 7 شب تا 7 صبح تاریک) نگهداری می‌شدند، تحت آزمایش قرار گرفتند. به جز در هنگام آزمایش، آب و غذا به صورت آزاد در اختیار آنها قرار داشت و حیوانات در قفس‌های چهار تایی نگهداری می‌شدند.

سه گروه 10 تایی از رت‌ها مورد آزمایش قرار گرفتند: 1- رت‌هایی که پس از جراحی، شریان‌های کلیوی آنها کلمپ نمی‌شدند و در سراسر آزمایش نرمال سالدین دریافت می‌کردند (شاهد)، 2- رت‌هایی که پس از جراحی، شریان‌های کلیوی آنها به مدت نیم ساعت کلمپ می‌گردیدند و در سراسر آزمایش نرمال سالدین دریافت می‌کردند (کنترل)، 3- رت‌هایی که پس از جراحی، شریان‌های کلیوی آنها به مدت نیم ساعت کلمپ می‌شدند و 15 دقیقه قبل از دوره پیش درمان یک تزریق بولوس نرمال سالدین حاوی L-NIL (ممانعت کننده انتخابی iNOS، شرکت Cayman Chemical آمریکا) به میزان 3 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن با حجم 1 میلی‌لیتر و سپس انفوزیون L-NIL به میزان 1 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در ساعت (9-11) به همراه نرمال سالدین با سرعت 3 میلی‌لیتر در ساعت دریافت می‌کردند. رت‌ها با تزریق داخل صفاقی پنتوباریتال سدیم (شرکت سیگما-آمریکا) به میزان 60 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش گردیدند. در تمام طول آزمایش در صورت نیاز با تزریق داخل وریدی 1/5 میلی‌گرم پنتوباریتال سدیم بیهوشی ادامه می‌یافت. جهت تسهیل نمودن تنفس خود به خودی پس از بیهوشی عمل تراکئوستومی با استفاده از کانول پلی اتیلن

(PE₂₀₀) انجام گرفت. شریان و ورید فمورال به ترتیب جهت ثبت فشار خون و تزریق نرمال سالین (3 میلی لیتر در ساعت) کانول گذاری شدند (PE₅₀). یک کانول پلی اتیلن با قطر مناسب جهت جمع آوری ادرار در مثانه قرار داده شد. در سراسر عمل جراحی، با استفاده از لامپ‌هایی که در زیر و روی میز جراحی قرار داشتند درجه حرارت بدن حیوان در محدوده 37 ± 1 درجه سانتی‌گراد حفظ می‌شد. پس از ایجاد یک برش طولی توسط کوتر (surgistat - ایران) بر روی شکم و باز کردن آن، شریان‌های چپ و راست کلیوی همه حیوانات به وسیله جراحی روباز شدند. بعد از گذشت یک دوره 2 ساعته استراحت جهت پایدار شدن وضعیت حیوان، مراحل آزمایش آغاز شدند. یک دوره کلیرانس نیم ساعته به عنوان دوره کنترل انجام می‌شد. بعد از شروع تزریق نرمال سالین یا L-NIL و گذشت 15 دقیقه، یک دوره کلیرانس نیم ساعته به عنوان دوره پیش درمان و به منظور بررسی اثر دارو بر روی سطوح پایه‌ای همودینامیک و عملکرد کلیوی انجام می‌گردید. پس از آن شریان‌های کلیه به مدت نیم ساعت کلمپ می‌شدند و بلافاصله پس از برداشتن کلمپ‌ها، چهار دوره کلیرانس نیم ساعته پشت سر هم انجام می‌گردید. در تمام دوره‌های کلیرانس، ادرار در ظروف مخصوص از قبل وزن شده جمع‌آوری و فشار خون حیوان توسط دستگاه پاورلوب مدل 8SP (ADInstruments استرالیا) ثبت می‌گردید. در انتهای تمام دوره‌های کلیرانس و ایسکمی، نمونه‌های خون شریانی (0/7 میلی‌لیتر) گرفته و بلافاصله سانتریفیوژ می‌شدند. پلاسما جدا گشته و گلبول‌های قرمز در یک حجم مساوی نرمال سالین مخلوط گشته و مجدداً به حیوان تزریق می‌گردید. جهت اندازه‌گیری میزان فیلتراسیون گلومرولی غلظت کراتینین توسط دستگاه اتوآنالایزر (Technicon, RA-1000، آمریکا) بر اساس واکنش آن با پیکرات قلیایی با روش ژافه (اندازه‌گیری مستقیم) تعیین شد. همچنین با استفاده از دستگاه آنالایزر ایزی لیت (مدیکا-آمریکا) غلظت سدیم نمونه‌های ادرار جهت اندازه‌گیری میزان دفع سدیم

اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری اسمولالیته نمونه‌های ادرار (U_{osm}) با استفاده از دستگاه اسمومتر (Osmomat 030) انجام گرفت. در انتهای آزمایش با گرفتن حجم زیاد و سریع خون، حیوانات کشته شدند.

در این تحقیق برای مقایسه کمیت‌های مختلف، از آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری مکرر (جهت اختلافات درون گروهی) و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن (جهت اختلافات بین گروهی) استفاده شده است.

در تمام طول آزمایش، کار با حیوانات بر اساس دستورالعمل کنترل و نظارت بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفته است.

نتایج

مقایسه دوره پیش درمان با دوره کنترل در جداول 1 و 2 و نمودارهای 1، 2، 3 و 4 نشان می‌دهد که پس از دادن L-NIL تغییر معنی‌داری در میانگین‌های فشار خون، میزان فیلتراسیون گلومرولی، دفع نسبی و مطلق سدیم و میزان جریان ادرار صورت نگرفته است. بخش خون‌رسانی مجدد در جدول 2 و نمودارهای 1، 2، 3 و 4 پاسخ‌های همودینامیک و دفعی کلیه به 30 دقیقه ایسکمی در گروه‌هایی که نرمال سالین یا L-NIL دریافت می‌کردند را توضیح می‌دهد. در گروه شاهد، هیچ تغییری در مراحل مختلف مشاهده نشد. در گروه کنترل، میانگین میزان فیلتراسیون گلومرولی طی دوره نیم ساعته اول نسبت به دوره کنترل و دوره معادل گروه شاهد تغییر معنی‌داری نکرد، در حالی که طی دوره‌های نیم ساعته دوم، سوم و چهارم پس از ایسکمی نسبت به مقادیر دوره کنترل و دوره‌های معادل گروه شاهد شدیداً کاهش یافتند ($p < 0/05$). اما در گروه دریافت کننده L-NIL، مقادیر میزان فیلتراسیون گلومرولی طی نیم ساعت‌های دوم، سوم و چهارم از خون‌رسانی مجدد، از گروه کنترل بالاتر بودند ($p < 0/05$) (نمودار 1).

جدول 1. مقایسه میانگین فشار خون بر حسب میلی متر جیوه ناشی از اثر ایسکمی-خونرسانی مجدد در سه گروه شاهد، کنترل و دریافت کننده L-NIL

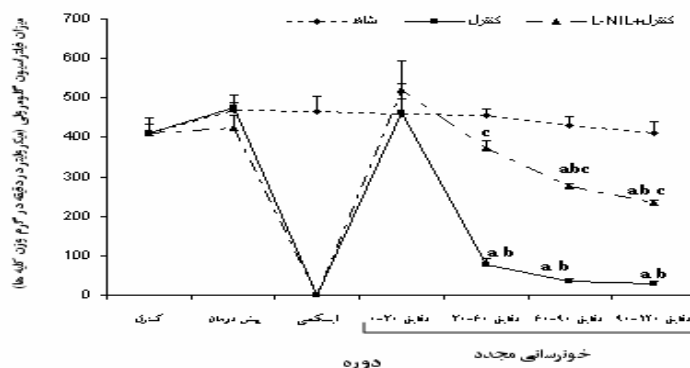
کنترل میانگین (انحراف معیار)	پیش درمان میانگین (انحراف معیار)	ایسکمی میانگین (انحراف معیار)	0-30 دقیقه از خونرسانی مجدد میانگین (انحراف معیار)	30-60 دقیقه از خونرسانی مجدد میانگین (انحراف معیار)	60-90 دقیقه از خونرسانی مجدد میانگین (انحراف معیار)	90-120 دقیقه از خونرسانی مجدد میانگین (انحراف معیار)	
(3/5)101/4	(2/8)100/8	(2/6)100/9	(2/5)100/8	(2/4)99/3	(2/2)98/5	(2/5)97/5	شاهد
(3/0)103/2	(3/1)103/6	(2/7)104/0	(2/7)104/2	(3/0)101/3	(2/9)102/5	(4/0)99/9	کنترل
(2/5)103/4	(2/1)105/0	(2/1)103/4	(2/0)105/2	(2/5)104/5	(2/2)103/9	(1/9)102/3	دریافت کننده L-NIL

دوره معادل در گروه کنترل. $p < 0/001$ *** در مقایسه با دوره کنترل همان گروه، $p < 0/05$ † در مقایسه با دوره معادل در گروه شاهد، و $p < 0/05$ ‡ در مقایسه با

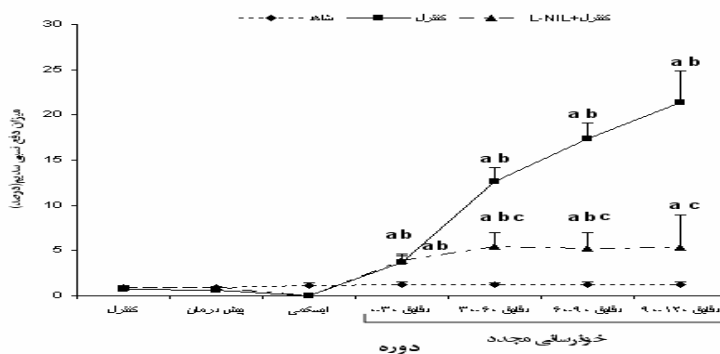
جدول 2. مقایسه میانگین جریان ادرار بر حسب میکرولیتر در دقیقه بر گرم وزن کلیه ناشی از اثر ایسکمی-خونرسانی مجدد در سه گروه شاهد کنترل و دریافت کننده L-NIL

کنترل میانگین (انحراف معیار)	پیش درمان میانگین (انحراف معیار)	ایسکمی میانگین (انحراف معیار)	0-30 دقیقه از خونرسانی مجدد میانگین (انحراف معیار)	30-60 دقیقه از خونرسانی مجدد میانگین (انحراف معیار)	60-90 دقیقه از خونرسانی مجدد میانگین (انحراف معیار)	90-120 دقیقه از خونرسانی مجدد میانگین (انحراف معیار)	
(0/5)3/7	(0/4)3/4	(0/4)3/7	(0/4)3/8	(0/4)3/8	(0/4)3/6	(0/4)3/2	شاهد
(0/3)2/9	(0/2)3/1	0	†(0/7)11/3 ***	*(1/4)7/4	*(0/8)5/4	*(0/6)5	کنترل
(0/3)4/0	(0/2)3/9	0	†‡(0/8)18/2 ***	†‡(1/1)17/4 ***	†‡(0/8)13/4 ***	†‡(1/0)11/3 ***	دریافت کننده L-NIL

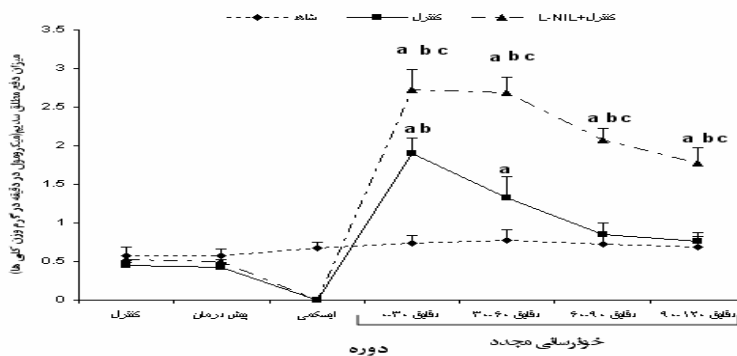
دوره معادل در گروه کنترل. $p < 0/001$ *** در مقایسه با دوره کنترل همان گروه، $p < 0/05$ † در مقایسه با دوره معادل در گروه شاهد، و $p < 0/05$ ‡ در مقایسه با



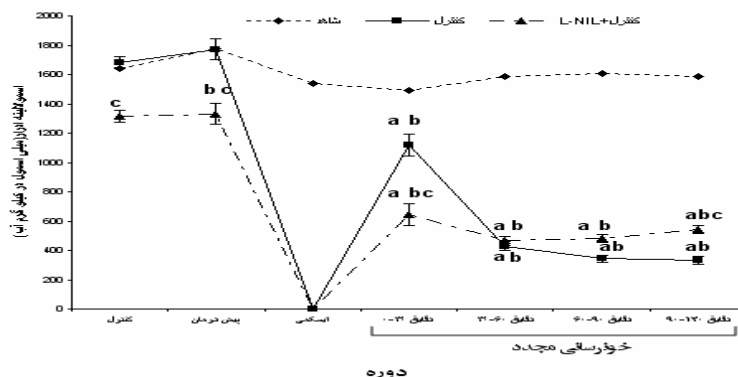
نمودار 1. مقایسه میانگین میزان فیلتراسیون گلومرولی بر حسب میکرومتر در دقیقه ناشی از اثر ایسکمی-خونرسانی مجدد در سه گروه شاهد، کنترل و L-NIL. $p < 0/05$ † در مقایسه با دوره کنترل در همان گروه، $p < 0/05$ ‡ در مقایسه با گروه شاهد، $p < 0/05$ ‡ در مقایسه با گروه کنترل.



نمودار 2. مقایسه میانگین دفع نسبی سدیم بر حسب درصد ناشی از اثر ایسکمی-خونرسانی مجدد در سه گروه شاهد، کنترل و L-NIL. $p < 0/05$ در مقایسه با دوره کنترل در همان گروه، $p < 0/05$ در مقایسه با گروه شاهد، $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل.



نمودار 3. مقایسه میانگین دفع مطلق سدیم بر حسب میکرومول در دقیقه ناشی از ایسکمی-خونرسانی مجدد در سه گروه شاهد، کنترل و L-NIL. $P < 0/05$ در مقایسه با دوره کنترل در همان گروه، $P < 0/05$ در مقایسه با گروه شاهد، $P < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل.



نمودار 4. مقایسه میانگین میزان اسمولالیتته ادراری بر حسب میلی اسمولی در کیلوگرم آب ناشی از ایسکمی-خونرسانی مجدد در سه گروه شاهد، کنترل و L-NIL. $p < 0/05$ در مقایسه با دوره کنترل در همان گروه، $p < 0/05$ در مقایسه با گروه شاهد، $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل.

تفاوت‌های ایجاد شده در پارامترهای عملکرد کلیه در دوره‌های مختلف آزمایش در هر گروه حاصل تغییرات فشار خون شریانی نبوده‌اند.

مطالعات متعدد بر روی انواع نارسایی حاد کلیوی القاء شده توسط عوامل توکسیک و ایسکمیک، حاکی از کاهش شدید میزان فیلتراسیون گلومرولی (Glomerular Filtration Rate-GFR) به علت کاهش جریان خون کلیوی، افزایش فشار کپسول بومن و نشت برگشتی می‌باشد (12). کاهش جریان خون کلیوی توسط افزایش انقباض عروق، به دلیل به هم خوردن تعادل در تولید مواد منقبض و منبسط کننده عروقی در درون کلیه و احتقان عروق مدولا ایجاد می‌گردد (13).

در گروه دریافت کننده دارو میانگین GFR در دوره پیش درمان نسبت به دوره کنترل خودش، دوره معادل پیش درمان گروه‌های کنترل و شاهد تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد. عدم تأثیرگذاری مهار iNOS بر روی GFR در این دوره به علت عدم بیان آن در شرایط عادی است. طی سی دقیقه اول پس از ایسکمی در گروه کنترل، GFR نسبت به دوره کنترل تفاوتی را نشان نداد که به علت انقباض شدیدتر در آرتریول‌های وابران که آنژیوتنسنین 2 (AngiotensinII-Ang-II) نقش مهمی در آن دارد (14)، نسبت به انقباض در آرتریول‌های آوران که بخشی از این انقباض به علت iNOS است، می‌تواند باشد. طی این دوره هنوز سطح بیان و فعالیت iNOS خیلی زیاد نیست زیرا GFR در گروه دریافت کننده L-NIL نسبت به دوره کنترل و نسبت به میزان آن در گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. طی دوره‌های نیم ساعته دوم، سوم و چهارم پس از ایسکمی در گروه کنترل، GFR نسبت به دوره کنترل شدیداً کاهش یافت که به دلیل افزایش انقباض در آرتریول‌های آوران و کاهش شدت انقباض در آرتریول‌های وابران بوده است. طی این سه دوره افزایش GFR در گروه دریافت کننده L-NIL بیان‌گر آن است که افزایش انقباض در آرتریول‌های آوران تا حد زیادی به علت افزایش بیان iNOS بوده است که با حذف اثرات تعدیل

میزان دفع نسبی سدیم (نمودار 2) در گروه‌های کنترل و دریافت کننده L-NIL طی چهار دوره نیم ساعته پس از ایسکمی، نسبت به دوره کنترل خودشان و دوره‌های معادل گروه شاهد افزایش یافت ($p < 0/05$)، در حالی که در گروه دریافت کننده L-NIL مقادیر دفع نسبی سدیم طی نیم ساعت‌های دوم، سوم و چهارم از خون‌رسانی مجدد نسبت به دوره‌های معادل در گروه کنترل بسیار کمتر بودند ($p < 0/05$).

مقادیر دفع مطلق سدیم (نمودار 3) در گروه کنترل طی دوره‌های نیم ساعته اول و دوم پس از ایسکمی، نسبت به دوره کنترل و نیز طی نیم ساعت اول پس از ایسکمی نسبت به دوره معادل در گروه شاهد افزایش یافتند ($p < 0/05$) و سپس طی یک ساعت آخر به تدریج به سمت مقادیر دوره کنترل بازگشتند. در حالی که، در گروه دریافت کننده L-NIL مقادیر دفع مطلق سدیم طی هر چهار دوره نیم ساعته از دوره خون‌رسانی مجدد نسبت به دوره کنترل خودش و نیز دوره‌های معادل گروه‌های شاهد و کنترل افزایش یافتند ($p < 0/05$).

در گروه کنترل طی دوره نیم ساعته اول پس از ایسکمی از مقادیر اسمولالیت ادرار (U_{osm}) (نمودار 4) در گروه‌های کنترل و دریافت کننده L-NIL طی چهار دوره نیم ساعته پس از ایسکمی نسبت به دوره کنترل خودشان و دوره‌های معادل در گروه شاهد کاهش نشان دادند ($p < 0/05$)، در حالی که در گروه دریافت کننده L-NIL طی دوره نیم ساعته چهارم پس از ایسکمی نسبت به مقادیر معادل در گروه کنترل افزایش یافتند ($p < 0/05$).

تغییرات مقادیر جریان ادرار در گروه‌های آزمایشی در جدول 2 نشان داده شده‌اند.

بحث

فشار متوسط شریانی (Mean Arterial Pressure-MAP) در دوره‌های مختلف با دوره کنترل در هر گروه و بین دوره‌های معادل در گروه‌های مختلف اختلاف قابل ملاحظه‌ای را نداشته است (جدول 1). در نتیجه

کننده NO تولیدی توسط eNOS باعث افزایش اثرات عوامل منقبض کننده نظیر Ang-II شده است (15-17). بهبودی GFR در اثر استفاده از ممانعت کننده‌های انتخابی iNOS در رت‌های مبتلا به نارسایی حاد کلیوی ایسکمیک (18-20)، نارسایی حاد کلیوی ناشی از لیوپلی ساکارید (19)، و نارسایی حاد کلیوی اندوتوکسمیک (22، 23) در مطالعات قبلی، نقش NO حاصل از القاء iNOS در کاهش یافتن GFR را مورد تأیید قرار می‌دهد.

تجویز L-NIL تغییری در مقادیر دفع مطلق سدیم و دفع نسبی سدیم طی دوره پیش درمان ایجاد نمود که به دلیل سطح پایین بیان iNOS در لوله‌های ادراری در شرایط طبیعی است (24). نتایج این تحقیق جزو معدود مطالعاتی است که نقش iNOS را در شرایط طبیعی در کنترل دفع کلیوی سدیم نشان می‌دهد.

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که دفع سدیم در انواع نارسایی حاد کلیوی بر اثر کاهش باز جذب لوله ای آن افزایش می‌یابد (7، 8، 12). بررسی روند تغییرات در دفع سدیم در گروه کنترل نشان دهنده آن است که دفع مطلق سدیم در نیم‌ساعت اول بعد از ایسکمی بیشترین میزان را دارد که به علت آسیب‌های ایجاد شده در توبول‌ها و عدم کاهش فیلتراسیون گلومرولی است ولی در زمان‌های نیم ساعته بعدی کاهش یافته که با توجه به روند کاهش GFR بعد از ایسکمی در گروه کنترل، کاهش در بار فیلترای سدیم دلیل افت دفع آن بوده است. لیکن دفع نسبی سدیم از بعد از ایسکمی به صورت پیشرونده افزایش یافته و در نیم ساعت آخر به حداکثر مقدار خود می‌رسد که مهم‌ترین علت آن افزایش شدت آسیب‌های توبولی طی دوره خون‌رسانی مجدد بوده است و عامل اصلی آن را سایر تحقیقات افزایش تولید مشتقات فعال اکسیژن و تشکیل پروکسی نیتريت در این مدت عنوان می‌نمایند (2، 5، 25). در گروه دریافت کننده L-NIL طی زمان‌های نیم ساعته دوم، سوم و چهارم بعد از ایسکمی کلیوی با وجود فیلتراسیون گلومرولی بسیار بالاتر از گروه کنترل، دفع نسبی سدیم بسیار کمتر از گروه کنترل است. دلایل آن علاوه بر این که احتمالاً بهبود صدمات

توبولی و هم‌چنین افزایش کسر فیلتراسیون می‌باشد، تا حدودی هم مرتبط با حذف اثرات مستقیم ناتریورتیک NO در میزان‌های بالا بوده است، زیرا در مطالعات متعددی اثبات شده است که NO در میزان‌های بالا باعث مهار باز جذب سدیم در لوله‌های ادراری می‌شود (26، 27) اما افزایش بسیار زیاد GFR و طبعاً بار فیلترای سدیم موجب افزایش مقدار دفع مطلق سدیم گردیده است.

تحقیقات متعدد بر روی نارسایی حاد کلیوی القاء شده توسط ایسکمی، نقص در قدرت تغلیظ کنندگی ادرار توسط کلیه‌ها را گزارش کرده‌اند (28، 29). مهم‌ترین عامل برقراری این شرایط، مختل شدن مکانیسم جریان مخالف تشدید شونده می‌باشد. کاهش زیاد در مقدار اسمولالیت ادرار (U_{osm}) به خصوص در زمان‌های نیم ساعته دوم، سوم و چهارم بعد از ایسکمی کلیوی در گروه کنترل تأیید کننده بروز افت در شیب اسموتیک ناحیه مدولا می‌باشد. طی این دوره کاربرد L-NIL باعث افزایش U_{osm} شده است که احتمالاً به دلیل کاهش شدت آسیب‌های توبولی به ویژه در بخش ضخیم بالارونده لوپ هنله (Thick Ascending Limb-TAL) و طبعاً فعال‌تر شدن مکانیسم جریان مخالف تشدید شونده توسط L-NIL است که همراه با برآیند تغییرات در جریان خون کلیوی به خصوص در ناحیه مدولا، فیلتراسیون گلومرولی و اثرات آنتی ناتریورتیک مستقیم L-NIL باعث می‌گردد که هیپراسمولالیت ناحیه مدولا نسبت به گروه کنترل طی یک ساعت آخر خون‌رسانی مجدد افزایش یابد.

نتیجه گیری

از لحاظ کلینیکی، کاربرد L-NIL به عنوان یک مهار کننده اختصاصی آنزیم iNOS، به میزان قابل توجهی از اختلالات در عملکردهای همودینامیک و دفعی کلیه در ساعات اولیه بعد از ایسکمی جلوگیری می‌نماید. از اینرو، احتمالاً آنزیم iNOS دارای نقش در بروز اختلالات در همودینامیک، عملکردهای دفعی و توانایی تغلیظ کنندگی کلیه در فاز اولیه خون‌رسانی مجدد بعد از ایسکمی می‌باشد.

9. Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2002; 61(3): 862-71.
10. Frank S, Zacharowski K, Wray GM, Thiernemann C, Pfeilschifter J. Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a novel nitric oxide-regulated gene in rat glomerular mesangial cells and kidneys of endotoxemic rats. *FASEB J* 1999; 13: 869-82.
11. Walpen S, Beck KF, Eberhardt W, Apel M, Chatterjee PK, Wray GM, et al. Downregulation of SPARC expression is mediated by nitric oxide in rat mesangial cells and during endotoxemia in the rat. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(3): 468-76.
12. Kribben A, Edelstein CL, Schrier RW. Pathophysiology of acute renal failure. *Nephrol J* 1999; 12(Suppl2): S142-51.
13. Lieberthal W. Biology of acute renal failure: Therapeutic implications. *Kidney Int* 1997; 52:1102-15.
14. Gholampour F, Shid Moosavi SM, Owji SM, Hajizadeh S. [Effect of angiotensin II receptor type 1 antagonist on renal hemodynamic and tubular responses to ischemia-reperfusion injury in rat]. *J Arak University of Medical Sciences* 2007; 10(1): 99-107.
15. Mount PF, Power DA. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol (Oxf)* 2006; 187(4): 433-46.
16. Gabbai FB. Effects of nitric oxide synthase blockers on renal function. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(Suppl1): 10-3.
17. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(8): 2199-210.
18. Chatterjee PK, Patel NS, Sivarajah A, Kvale EO, Dugo L, Cuzzocrea S, et al. GW274150, a potent and highly selective inhibitor of iNOS, reduces experimental renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2003; 63(3):853-65.
19. Lortie MJ, Ishizuka S, Schwartz D and Blantz RC. Bioactive products of arginine in sepsis: tissue and plasma composition after LPS

تشکر و قدر دانی

این تحقیق در گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

1. Bayat GR, Shid Moosavi SM, Owji SM. Effect of a selective adenosine A1- receptor antagonist, DPCPX, on renal tissue damages and functional disturbances in early phase of ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in anesthetized rats. [MSc Thesis]. Shiraz University of Medical Sciences, 2003.
2. Schneider R, Raff U, Vornberger N, Schmidt M, Freund R, Reber M, et al. L-arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int* 2003; 64: 216-5.
3. Walker LM, Walker PD, Imam SZ, Ali SF, Mayeux PR. Evidence for proxynitrite formation in renal ischemia-reperfusion injury: Studies with the inducible nitric oxide synthase inhibitor L-N6-(1-iminoethyl) lysine. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 417-2.
4. Schwartz D, Mendonea M, Schwartz I, Xia Y, Blantz RC. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin Invest* 1997; 100: 439-8.
5. Hestin D, Johns EJ. The influence of allopurinol on kidney haemodynamic and excretory responses to renal ischemia in anesthetized rats. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 255-61.
6. ling H, Edelstein C, Gengaro P, Meng X, Lucia S, Knotte K, et al. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 1999; 277: F383-90.
7. Brady HR, Brenner BM, Clarkson MR, Lieberthal W. Acute renal failure. In: Brenner M. editor. *The Kidney*. Philadelphia: Saunders; 2000. p. 1201-27.
8. Green J, Abassi Z, Winaver J, Skorecki KL. Acute renal failure: Clinical and pathophysiological aspects. In: Seldin DW, Giebissch G. editors. *The Kidney*. Philadelphia: Lippincott; 2000. p. 2329-73.

- and iNOS blockade. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278(6): C1191-9.
20. Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol* 2001; 281: F948-57.
21. Schwartz D, Brasowski E, Raskin Y, Schwartz IF, Wolman Y, Blum M, et al. The outcome of non-selective vs selective nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide treated rats. *J Nephrol* 2001; 14(2):110-4.
22. Wang W, Jittikanont S, Falk SA, Li P, Feng L, Gengaro PE, et al. Interaction among nitric oxide, reactive oxygen species, and antioxidants during endotoxemia-related acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284(3): F532-7.
23. Chiao CW, Lee SS, Wu CC, Su MJ. N-Allylsecoboldine as a novel agent prevents acute renal failure during endotoxemia. *Eur J Pharmacol* 2006; 535(1-3): 291-300.
24. Moreno C, Lopez A, Llionos MT, Rodríguez F, López-Farré A, Nava E, et al. Changes in NOS activity and protein expression during acute and prolonged ANG II administration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 282: R31-7.
25. Schram L, La M, Heidbreder E, Hecker M, Beckman JS, Lopau K, et al. L-arginine deficiency and supplementation in experimental acute renal failure and in human kidney transplantation. *Kidney Int* 2002; 61: 1423-32.
26. Liang M, Knox FG. Production and functional roles of nitric oxide in the proximal tubule. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: R1117-24.
27. Yangisawa H, Nodera M, Umemori Y, Shimoguchi Y, Wada O. Role of angiotensin II, endothelin-1 and nitric oxide in HgCl₂-induced acute renal failure. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998, 152: 315-26.
28. Hanley MJ. Isolated nephron segments in a rabbit model of ischemic acute renal failure. *Am J Physiol* 1980; 239: F17-23.
29. Johnston PA, Rennke H, Levinsky NG. Recovery of proximal tubular function from ischemic injury. *Am J Physiol* 1984; 246: F159-66.

The role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in anaesthetized rats

Gholampour F¹, Moosavi SMS^{2*}, Owji SM³, Hajizadeh S⁴

1- PhD of physiology, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

2- Associated Professor of Physiology, Department of Physiology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

3- Assistant Professor of Pathology, Department of Pathology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

4- Professor of Physiology, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

Received 2 March, 2009 Accepted 17 Aug, 2009

Abstract

Background: Ischemia/reperfusion-induced acute renal failure causes excretory functional disorders of nephrons. Ischemia/reperfusion injury increases iNOS expression in the renal tissue. Inhibition of iNOS expression and its activity can ameliorate ischemia/reperfusion-induced renal injury. The aim of this study was to determine the role of iNOS on progression of renal functional disturbances over the immediate post-ischemic reperfusion period.

Materials and Methods: In this experimental study, renal hemodynamic and excretory functions were evaluated in male Sprague-Dawley rats. First, a 30-min control clearance period was taken. Then following bilateral renal artery clamping for 30 minutes, four consecutive 30-min clearance periods were taken during reperfusion, while saline or L-NIL as a selective iNOS inhibitor was infused. In plasma and urine samples, Cr and sodium concentration levels were measured.

Results: Renal ischemia for 30 minutes decreased glomerular filtration rate and urine osmolality during reperfusion and increased urine flow and sodium excretion. L-NIL did not change the glomerular filtration rate and urine osmolality prior to ischemia but it improved them during reperfusion and there were progressive increases in urine flow. Additionally, L-NIL lowered ischemia-induced rises in sodium excretion.

Conclusion: iNOS had a considerable role in the development of disorders in hemodynamic and excretory renal functions during early hours after ischemia.

Keywords: Glomerular filtration, iNOS enzyme, Ischemia, L-NIL, Reperfusion

*Corresponding author;

Email: Shidmoosavi@yahoo.com

Address: Physiology Department, Medicine Faculty, Zand St., Shiraz, Iran